

Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (Molecular docking and antibacterial activity thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea and (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea)

Fabían Martínez-Flores¹, José Jaime Vázquez-Bravo², Juan Saulo González-González¹, Julio Hernández-Rosas¹, Veronica Castro-Bear³, Oscar Zuñiga-Lemus¹✉

¹Universidad de la Cañada. Carretera Teotitlán-San Antonio Nanahuatipan Paraje Titacuaitla, Km. 1.7 s/n; Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, 68540, México.

²Instituto Tecnológico Superior de Atlixco, Prolongación Heliotropo No. 1201, Col. Vista Hermosa C.P. 74218, Atlixco, Puebla, México.

³Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. Carretera Libramiento Tecnológico San Marcos Necoxtla Km. 7.5, Lázaro Cárdenas Sur, 75859 Tehuacán, Puebla

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 27 de Febrero de 2013. Aceptado: 27 de Mayo de 2013.

Resumen

Las tioureas, son compuestos resultantes de sustituir el átomo de oxígeno de la urea (NH₂CONH₂) por un átomo de azufre (NH₂CSNH₂). Actualmente se ha visto que las tioureas presentan diversas actividades biológicas, dentro de las que se encuentra la antimicrobiana. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana mediante acoplamiento molecular entre la enzima DNA girasa (receptor) y las tioureas (R, R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) como ligando en busca del posible mecanismo de acción de estos compuestos, los resultados muestran que existe interacción entre la enzima y ambas tioureas en el sitio activo. Por otro lado, también se evaluó la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, mediante el método de microdilución en caldo con la adición de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad, mostrando una disminución de la misma sólo contra las bacterias gram negativas, siendo la tiourea CYTU2 la que mostró mejor actividad antibacteriana.

Palabras clave

Tioureas N,N'-Disustituidas quirales, Acoplamiento Molecular, DNA girasa, actividad antibacteriana.

Abstract

Thioureas are resultant compounds of substitute the oxygen atom from urea (NH₂CONH₂) for a sulfur atom (NH₂CSNH₂). There are evidential that show the biological activity of thioureas, within which are antibacterial activity. We studied the antibacterial activity of two thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea (CYTU2) in silico using Molecular Docking between the DNA gyrase enzyme (receptor) and the two thioureas (ligand). The results showed interaction between DNA girase and both thioureas on the pocket of the enzyme. By other hand, the biological activity was evaluated against the following bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*, using the microdilution method broth with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as part of the viability assay, the results show decrease in viability only in gram-negative strains, being the thiourea CYTU2 the that exhibited a better antibacterial activity.

Keywords

N,N'-Disubstituted thioureas, Molecular Docking, DNA gyrase, antibacterial activity.

Introducción

Para que la duplicación del DNA se lleve a cabo en bacterias, la topoisomerasa IV y la DNA girasa juegan un papel muy importante, siendo ambas enzimas topoisomerasas tipo II, capaces de modificar la topología del DNA durante el proceso de replicación facilitando la segregación cromosómica (1). Ambas topoisomerasas son blanco de moléculas antibacterianas, como lo son las quinolonas o las cumarinas (2).

Las quinolonas son antibióticos los cuales han sido utilizados por décadas debido a que poseen un espectro amplio sobre bacterias gram positivas y gram negativas (3). Estos compuestos ejercen su efecto por la unión de manera no covalente al complejo ternario DNA-proteína previamente formado, previniendo que las cadenas de DNA separadas se vuelvan a unir durante el proceso de replicación, con lo cual generan lesiones en el material genético y la muerte de las bacterias (4, 5). Sin embargo, las quinolonas pierden su efecto por la generación de resistencia bacteriana, debido a los mecanismos que estos microorganismos han desarrollado para defenderse. Dentro de estos mecanismos se encuentran: la disminución en porinas en la membrana de gram negativas que evitan la penetración del fármaco al interior de la célula, la obtención de bombas de eflujo como lo es AcrAB/To1C en *Escherichia coli* (6, 7), la protección de DNA girasa y topoisomerasa IV por la proteína Qnr, la cual promueve el desarrollo de mutantes (8) por la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para la girasa y topoisomerasa IV (9,10).

Debido a que la resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en un problema de salud, es perentorio contar con una amplia gama de fármacos antimicrobianos, por lo cual se ha incrementado la necesidad de diseñar nuevos agentes antibacterianos con mejor actividad y menor toxicidad (11); entre estos se encuentran las tioureas, las cuales son compuestos orgánicos resultantes de sustituir el átomo de oxígeno de la urea (NH_2CONH_2) por un átomo de azufre (NH_2CSNH_2). Las tioureas poseen diversas actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar: anti-VIH, antiviral, antibacteriana, antifúngica, anticonvulsiva, analgésica, e inhibidores de la corrosión y antioxidantes (11-17).

El objetivo de este estudio fue determinar, mediante estudios *in silico*, la capacidad de

reconocimiento de las tioureas (ligando): (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea denominada CYTU1 y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea denominada CYTU2 hacia la DNA girasa, ya que esta enzima juega un papel importante en la duplicación del material genético durante la división celular y evaluar la actividad antibacteriana de estos compuestos "in vitro", usando para ello el método de microdilución en caldo (18) con la adición de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad.

Materiales y metodos

Síntesis de la (R, R)-*N,N'*-Bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R, R)-*N,N'*-Bis-[1-(1-fenil)etil]tiourea (CYTU2).

La reacción de (R)-(+)-1-(1-naftil)etilamina o (R)-(-)-1-ciclohexiletilamina en presencia de CS_2 (2:1) y etanol bajo irradiación de microondas condujo a la formación de la correspondientes tioureas (CYTU1) y (CYTU2). Los productos fueron sólidos blancos con punto de fusión de 163-165 °C y 181-183 °C respectivamente, que al recristalizarse en EtOH dieron lugar a la formación de agujas incoloras. La rotación óptica de los compuestos es $[\alpha]_D^{25} +31.2^\circ$ (R, R) para (CYTU1) y $[\alpha]_D^{25} -171.4^\circ$ (R, R) para (CYTU2) (c 1, CHCl_3). Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se efectuaron en los espectrómetros Varian Mercury-400, Varian Mercury-300, Varian Mercury-200 con software VNMR 6.1 C y un Jeol GX 400, los espectros de RMN bidimensionales de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY), heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) y (HMBC) se efectuaron en el espectrómetro Varian Mercury-400; los desplazamientos químicos se expresan en ppm hacia campo bajo tomando como referencia al tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0.0$); las constantes de acoplamiento (J), en Hertz (Hz). Los espectros de masas mediante la técnica de impacto electrónico IE fueron registrados con un espectrómetro JEOL JMS-SX 102A operado en el modo ion positivo a 70 eV; los datos se expresaron en unidades masa/carga (m/z). Los espectros de masas FAB+ se registraron con un espectrómetro JEOL JMS AX505HA. Los espectros de IR fueron registrados en un aparato Nicolet FT-IR Magna 700 en pastillas de KBr y de polietileno. La rotación óptica fue medida en un polarímetro Perkin-Elmer 241 (19).

Minimización de las estructuras

La estructura tridimensional de la DNA girasa a evaluar se obtuvo del Protein Data Bank con código

de identificación 2XCT (www.pdb.org). Para llevar a cabo el acoplamiento molecular, las estructuras moleculares minimizadas de las tioureas (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) (Figura 1) se generaron mediante minimización a 300°K por 10ps, empleando como campo de fuerza CHARMM22-PROT mediante el software VEGA ZZ ver 3.0.1, para posteriormente optimizarlas hasta un gradiente menor o igual a 0.01kcal/Å empleando un análisis conformacional en gradiente conjugado con Ammp. Las propiedades calculadas incluyen el coeficiente de partición octanol agua (LogP), el área topológica de la superficie polar (tPSA) y el Coeficiente de Refractividad Molar (CMR) obtenidos por medio del software Molecular Operating Environment (MOE) ver 2010.10.

Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular se realizó usando como molde la enzima DNA girasa obtenida del Protein Data Bank (PDB), la cual reporta como ligando el antibiótico ciprofloxacina en el sitio activo. El dominio catalítico de la enzima descargada presenta una resolución de 3.35Å, el sitio activo fue determinado mediante el Site-Finder del programa MOE ver 2010.10. Para llevar a cabo el análisis conformacional, se uso un método estocástico, basados en el protocolo de acoplamiento rígido-rígido, seguido de un rígido-flexible y flexible-flexible. Finalmente, el complejo enzima-ligando fue visualizado con MOE. Usando este

mismo protocolo, se obtuvieron los datos con la Ciprofloxacina, el cual no fue necesario minimizar ya que la estructura obtenida del PDB lo ubica en el sitio activo de la enzima.

Crecimiento bacteriano.

Para este estudio se trabajó con cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* las cuales fueron aisladas de muestras clínicas e identificadas en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las bacterias se crecieron en agar Müller-Hinton por 24 horas a 37°C. Una vez en fase exponencial se inoculó un matraz con 20 mL de caldo Müller-Hinton tomando cinco colonias aisladas de la misma forma morfológica por cada 5mL de caldo, se incubó a 37°C hasta alcanzar la turbidez de 0.5 del Nefelometro de McFarland monitoreado espectrofotométricamente a 650 nm (20).

Actividad antimicrobiana

Las bacterias en fase exponencial y ajustadas a 0.5 del Nefelometro de McFarland, se colocaron en tubos ependorff estériles de 1mL en donde se expusieron por 24 y 48 horas a una concentración de 10 y 100µM de las tioureas disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO), como control positivo se utilizó ciprofloxacina en las mismas concentraciones y

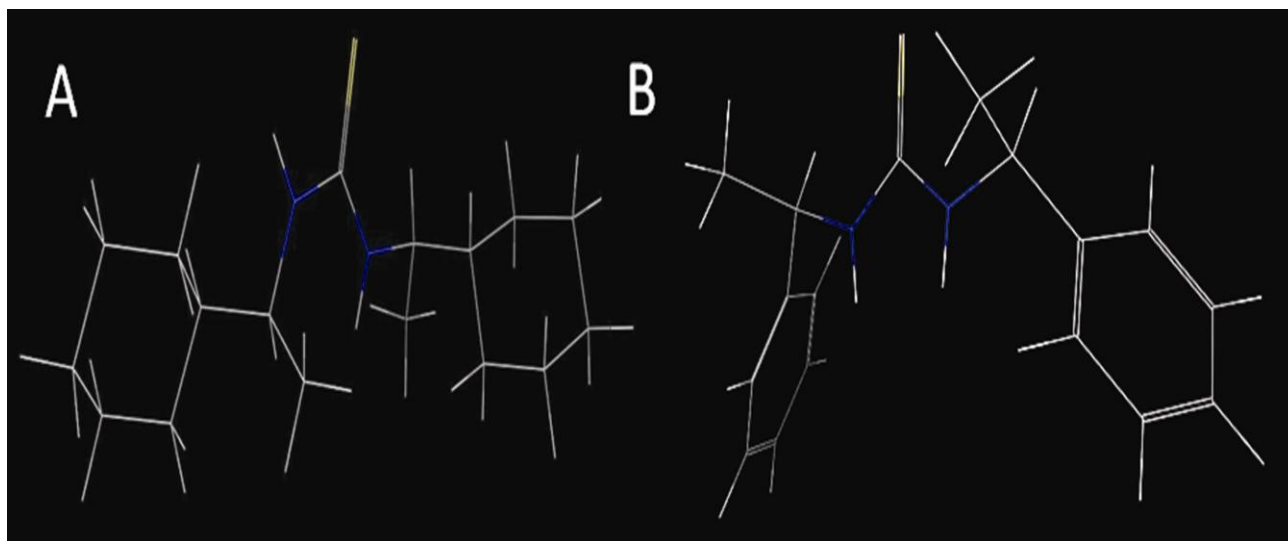


Figura 1. Estructura moleculares minimizadas de las tioureas. La figura A corresponde a la estructura minimizada de (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1), la figura B corresponde a la estructura minimizada de (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos: Coeficiente de partición Octanol-Agua (LogP), área topológica de superficie polar (tPSA) y Coeficiente de Refractividad Molar (CMR). Afinidad (pki), energía y eficiencia de las tioureas y la ciprofloxacina en los experimentos de acoplamiento con la DNA girasa

Compuestos	Parámetros fisicoquímicos					
	LogP	tPSA	CMR	Energía (Kcal/mol)	pKi	Eficiencia
CYTU1	4.388	56.15	9.8003	-9.758 + 2.47	6.229 + 0.49	0.311 + 0.02
CYTU2	4.164	56.15	9.6119	-11.846 + 2.15	6.714 + 0.27	0.335 + 0.01
Ciprofloxacina	1.101	72.88	8.7159	-13.853 + 1.34	11.323 + 0.88	0.472 + 0.04

Parámetros fisicoquímicos de los complejos con DNA girasa y los derivados de tioureas (R, R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletíl)tiourea (CYTU2), calculadas con MOE

tiempos de exposición. Como control negativo se usaron las bacterias sin tratamiento. La actividad antimicrobiana (concentración inhibitoria mínima, CIM) se determinó por el método de microdilución en caldo de acuerdo al protocolo M7 descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (18), el cual fue modificado al usar bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad (21). El MTT es usado en estudios de proliferación celular ya que es posible cuantificar la actividad de la deshidrogenasa presente en las células vivas, esta enzima reduce el Tetrazolio (MTT) a formazan, el cual es insoluble en agua y posee una coloración purpura, permitiendo correlacionar la viabilidad en los cultivos. El MTT fue adicionado a todos los cultivos 30min antes de sacarlos de incubación. Los cristales azules de formazan generados en el interior de las células se solubilizaron con isopropanol ácido permitiendo la cuantificación espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570nm (22, 23) previa separación del paquete celular mediante centrifugación.

Análisis Estadístico

Se realizaron 3 réplicas por separado para cada uno de los ensayos antimicrobianos. Los valores del porcentaje de viabilidad bacteriana están reportados como el promedio \pm desviación estándar (SD) de los cultivos por triplicado obtenidos en ensayos distintos. Los datos se analizaron por ANOVA seguidos por una prueba de Dunn. Estas pruebas estadísticas fueron realizadas usando el software Stata 8.0 (Stata Corp., College Station, TX). Las diferencias en los tratamientos fueron consideradas como significativas cuando la $P < 0.05$.

Resultados

La Tabla 1 muestra las propiedades moleculares de las tioureas estudiadas. Se obtuvieron valores de LogP de 4.388 para CYTU1 y 4.164 para CYTU2, lo que indica que ambas moléculas son más solubles en octanol, siendo para CYTU1 ligeramente mayor que para CYTU2. El valor del área topológica de la superficie polar (tPSA) es de 56.15 para ambas tioureas ya que ambas estructuras presentan el mismo número de grupos funcionales polares, el valor de tPSA es de 72.88 para ciprofloxacina. El Coeficiente de Refractividad molar es de 9.8003 para CYTU1, de 9.6119 para CYTU2 y de 8.7159 para la ciprofloxacina.

Los resultados del acoplamiento molecular entre la enzima DNA girasa y las tioureas CYTU1 y CYTU2 con MOE (ver 2010.10) muestran un posible reacomodo entre las tioureas (ligando) y la enzima DNA girasa (receptor) indicando una probable interacción entre ambas estructuras. Esta interacción puede causar la inhibición del crecimiento bacteriano. Ya que uno de los mecanismo de los antibacterianos es el reconocimiento de la DNA girasa (3). Los datos muestran que los aminoácidos que presentan mayor interacción con la enzima son Glu585 y Pro1083 con los grupos amino de ambas tioureas por formación de puentes de hidrógeno (Figuras 2 y 3).

Los resultados mostraron que las tioureas presentan una afinidad de 6.229 ± 0.49 para CYTU1 y de 6.714 ± 0.27 para CYTU2, por lo que es posible considerarse como de buena afinidad (pKi) por esta enzima (Tabla 1), presentan una eficiencia superior a 30% en ambos casos y una energía libre de Gibbs negativa -9.758 ± 2.47 para CYTU1 y de -11.846 ± 2.15

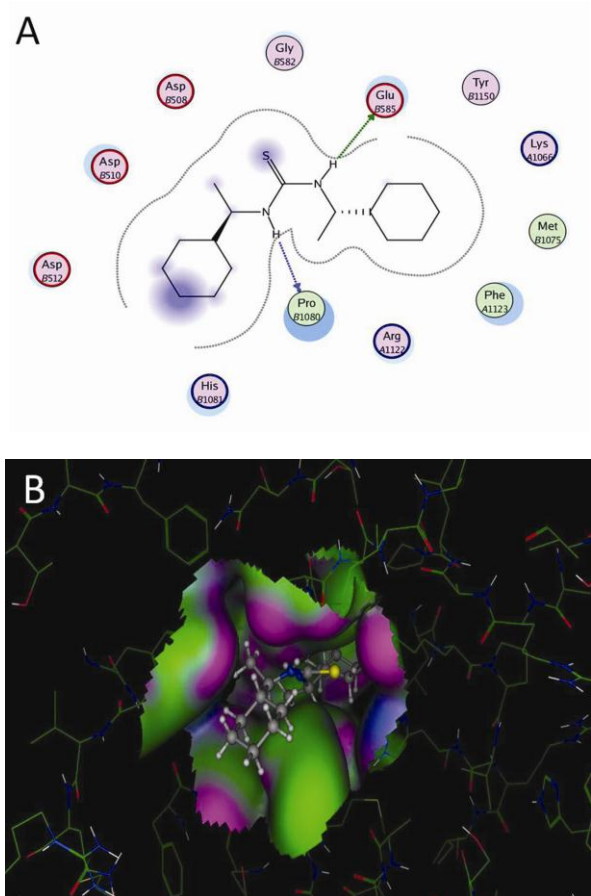


Figura 2. Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la DNA girasa y la tiourea (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1). La figura A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la DNA girasa y la tiourea CYTU1. La figura B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la DNA girasa y la tiourea CYTU1; el verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar

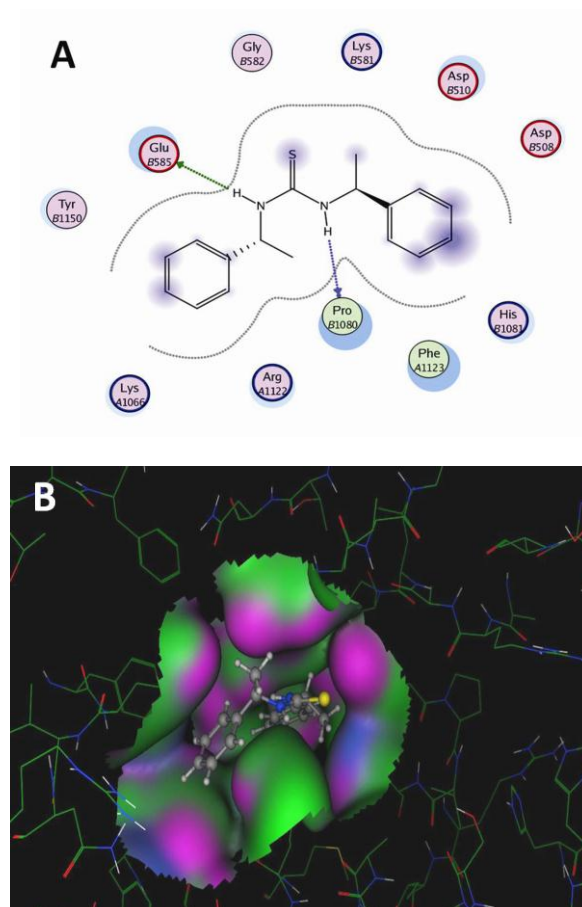


Figura 3. Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la DNA girasa y la tiourea (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2). La figura A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la DNA girasa y la tiourea CYTU2. La figura B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la DNA girasa y la tiourea CYTU2; el verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar

para CYTU2, siendo en todos los casos mejor para CYTU2 que para CYTU1, por lo cual es posible que CYTU2 se una a la DNA girasa de manera similar que la ciprofloxacina ya que el estudio con este antibiótico arrojó una energía libre de Gibbs de -13.853 ± 1.34 y una afinidad de 11.323 ± 0.88 (Tabla 1).

Los ensayos de actividad antibacteriana con la adición del MTT indicaron que la tiourea CYTU2 es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de manera dosis y tiempo dependiente (Tabla 2) sobre las cepas gram negativas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* obteniendo porcentajes de viabilidad de 45.03 ± 3.37 (*) y 55.97 ± 2.65 (*) respectivamente

a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en un tiempo de 48 horas, comparado con el antibiótico ciprofloxacina el cual inhibió el crecimiento bacteriano de manera significativa únicamente sobre la cepa de *Pseudomonas fluorescens* obteniendo un porcentaje de viabilidad de 55.91 ± 4.05 (*) en la concentración de $100\mu\text{M}$ en el tiempo de 24 horas, de 60.23 ± 3.05 (*) y de 49.19 ± 0.72 (*) en la concentración de $10\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$ respectivamente a 48 horas. Estos datos concuerdan con los datos in silico. Demostrando de esta manera que la tiourea CYTU2 presenta mejor actividad que la tiourea CYTU1.

Tabla 2. Porcentaje de Viabilidad de los cultivos bacterianos expuestos a los derivados de tioureas y la ciprofloxacina

Microorganismo	Compuesto	Concentración μM	TIEMPO (Hrs)	
			24	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	CYTU1	0	100.0 \pm 4.86	100 \pm 7.33
		10	110.41 \pm 7.28	97.28 \pm 4.6
		100	123.47 \pm 4.19	93.20 \pm 4.01
	CYTU2	0	100 \pm 0.26	100 \pm 1.97
		10	119.9 \pm 7.39	115.2 \pm 5.76
		100	114.3 \pm 1.79	100.9 \pm 1.22
<i>Escherichia coli</i>	CYTU1	0	100 \pm 8.39	100 \pm 5.06
		10	97.57 \pm 5.31	88.06 \pm 2.05
		100	100.0 \pm 2.98	81.31 \pm 3.23
	CYTU2	0	100 \pm 7.82	100 \pm 5.31
		10	95.65 \pm 7.08	80.68 \pm 5.01
		100	87.67 \pm 1.11	55.97 \pm 2.65(*)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CYTU1	0	100 \pm 3.13	100 \pm 4.49
		10	87.88 \pm 3.85	89.57 \pm 1.7
		100	73.07 \pm 3.05	80.47 \pm 3.89
	CYTU2	0	100 \pm 7.82	100 \pm 4.49
		10	79.83 \pm 3.09	51.27 \pm 4.05(*)
		100	78.37 \pm 0.29	45.03 \pm 3.37(*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ciprofloxacina	0	100 \pm 4.86	100 \pm 0.4
		10	100 .01 \pm 5.9	98.89 \pm 1.26
		100	97.03 \pm 1.45	87.81 \pm 2.76
<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacina	0	100 \pm 2.09	100 \pm 1.93
		10	89.1 \pm 4.79	88.02 \pm 63
		100	88 \pm 3.09	82.56 \pm 4.56
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ciprofloxacina	0	100 \pm 3.13	100 \pm 4.49
		10	75.4 \pm 7.54	60.23 \pm 3.05 (*)
		100	55.91 \pm 4.05 (*)	49.19 \pm 0.72 (*)

Los resultados denotan porcentaje de viabilidad bacteriana en experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos denotan diferencia significativa con respecto al control usando la prueba de Dunn ($P < 0.05$). (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea (CYTU1) y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletíl)tiourea (CYTU2).

Discusión

Todos los organismos poseen fuentes para preservar su información e integridad estructural del genoma. Muchas funciones celulares involucran el DNA, incluyendo replicación, transcripción y recombinación (24). En bacterias gram negativas como gram positivas, la resistencia bacteriana está asociada con mutaciones en la topoisomerasa IV, DNA girasa,

puede estar mediada por la salida del fármaco por bombas (25, 26) o en asociación con más de dos mecanismos (27, 28). En este sentido, las tioureas las cuales se presentan como moléculas con posible actividad antibacteriana se estudiaron para conocer si poseen esta actividad biológica, los resultados *in silico* entre la DNA girasa (enzima) y las tioureas (ligando) mostraron una interacción favorable, además de mostrar una inhibición significativa del crecimiento bacteriano al evaluarse la tiourea denominada CYTU2

en la concentración de 100µM a 48 horas mediante el protocolo modificado M7 del NCCLS sobre las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*.

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos indican que ambas tioureas poseen una baja solubilidad en agua sin embargo tienen la capacidad de pasar a través de membranas celulares, por lo cual pueden ser catalogadas dentro del grupo II de la clasificación biofarmacéuticas (BSC) como moléculas de baja solubilidad y con alta permeabilidad (29). El valor de tPSA para la ciprofloxacina es mayor que para las tioureas por la presencia de una mayor cantidad de grupos polares, de igual forma el valor de CRM para el antibiótico es mayor que el de las tioureas debido a la presencia de los anillos en los extremos lo que aumenta la densidad electrónica de las moléculas.

La ciprofloxacina la cual es un antibiótico de amplio espectro, reconoce las enzimas encargadas de la remodelación del genoma (topoisomerasa IV y la DNA girasa) (1), en este estudio presentó un efecto antibacteriano sólo sobre la cepa de *Pseudomonas fluorescens*, no así sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Mientras que la tiourea CYTU2 mostró un efecto antibacteriano sobre las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*

presentando un espectro antibacteriano más amplio que el antibiótico.

Los datos del acoplamiento molecular sugieren una interacción entre la enzima DNA girasa (receptor) y las tioureas CYTU1 y CUTU2 (ligando) en el sitio activo de la enzima. Inicialmente se reconstruyó el sitio activo de la enzima usando el programa MOE y modeló la conformación más estable de las tioureas, mediante el programa VEGA ZZ y MOE. Dicho acoplamiento mostró que la tiourea CYTU2 posee una afinidad por la DNA girasa similar a la ciprofloxacina, lo que ayudaría a explicar el efecto de inhibición observado mediante el ensayo de MTT al ser expuestos los cultivos bacterianos de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* a esta tiourea.

Con la información obtenida en este estudio se puede concluir que la tiourea compuesto (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) presenta actividad antibacteriana similar a la ciprofloxacina, permitiendo considerar a esta tiourea como candidato a seguir estudiando en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana.

Referencias

1. Zechiedrich EI, Cozzarelli Nr. Replications of topoisomerases IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 1995; 9:2859-69. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
2. Sifaoui F, Lamour V, Varon E, Moras D, Gutmann L. ATP-Bound conformation of Topoisomerase IV: a Possible Target for Quinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2003; 185: 6137-46. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
3. Naber KG, Adam D. Classification of fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10: 255-7. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
4. Goss WA, Deitz WH, Cook TM. Mechanism of action of nalidixic acid an *Escherichia coli* -II - Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol.* 1965; 89:1068-74. [[PubMed](#)]
5. Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol. Microbiol.* 2005; 56: 1416-29. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
6. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat.* 2000; 3: 303-11. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
7. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(4):671-701. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
8. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 2006; 12: 83-8. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
9. Yohida H, Kojima T, Yamagishi J, Nakamura S. Quinolone-resistant mutations of the gyrA gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1988; 211: 1-7. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
10. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 1271-2. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
11. Limban C, Marutescu L, Chifiriuc MC. Synthesis, Spectroscopic properties and Antipathogenic Activity of New Thiourea derivatives. *Molecules.* 2011; 16: 7593-607. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
12. Abdullah BH, Salh YM. Synthesis, characterization and biological activity of N-phenyl-N-(2-phenyl)thiourea (PPTH) and its metal complexes of Mn(II), Co(II),

- Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Pd(II), Pt(II) and Hg(II). *Oriental J Chem* 2010; 26: 763-73. [\[Google scholar\]](#)
13. Çelen AÖ, Kaymakçioğlu B, Gümrü S, Toklu HZ, Arıcıoğlu F. Synthesis and anticonvulsant activity of substituted thiourea derivatives. *Marmara Pharm J* 2011; 15: 43-7. [\[Google scholar\]](#)
 14. Desai AD, Mahajan DH, Chikhalia K. Synthesis of novel aliphatic thiourea derivatives containing s-triazine moiety as potential antimicrobial agents. *Ind J Chem*. 2007; 46B: 1169-73. [\[Google scholar\]](#)
 15. Kilcigil GA, Altanlar N. Synthesis and antifungal properties of some benzimidazole derivatives. *Turk J Chem*. 2006; 30: 223-8. [\[Google scholar\]](#)
 16. Patel RB, Chikhalia KH, Pannecouque C, de Clercq E. Synthesis of novel PETT analogues: 3,4-dimethoxy phenyl ethyl 1,3,5-triazinyl thiourea derivatives and their antibacterial and anti-HIV studies *Braz Chem Soc*. 2007; 18: 312-21. [\[Google scholar\]](#)
 17. Struga M, Kossakowski J, Kedzierska E, Fidecka S, Stefanska J. Synthesis and pharmacological activity of urea and thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.2.0(2,6)]undec-8-ene-3,5-dione. *Chem Pharm Bull*. 2007; 55: 796-9. [\[Google scholar\]](#)
 18. Vázquez J, Bernès S, Reyes Y, Moya M, Sharma P, Alvarez C, Gutiérrez R. Solvent-free synthesis of chiral N,N'-disubstituted thioureas by "just mixing" the reagents. *Synthesis* 2004; 12: 1955-8. [\[Google scholar\]](#)
 19. Cavaleri JS, Rankin DI, Harbeck JK, Sautter LR, McCarter SY, Sharp SE, Ortez HJ, Spiegel AC. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology, Seattle, Washington, 2005.
 20. McFarland J. The nephelometer: An Instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*. 1907; 14: 1176-78. [\[Google scholar\]](#)
 21. Ramírez-A LS, Marin Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de Compuestos de origen vegetal. *Scientia et Tech*. 2009; 42: 263-8. [\[Google scholar\]](#)
 22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 23. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 1986; 89: 271-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 24. Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol*. 2005; 351, 545-61. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 25. Baranova NN, Neyfakh AA. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 1396-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 26. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 2032-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 27. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis*. 2002; 9: 530-38. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 28. Varon E, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:302-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
 29. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995; 12:413-20. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)

Como citar este artículo: Martínez-Flores F, Vázquez-Bravo JJ, González-González JS, Hernández-Rosas J, Castro-Bear V, Zuñiga-Lemus O. Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletíl)tiourea *Avan Biomed* 2013; 2: 68-75.